

ラテックス凝集反応により測定した犬の血漿シスタチン C 濃度の有用性の検討

宮川 優一

日本獣医生命科学大学・獣医学部獣医学科・獣医高度医療学教室

日獣生大研報 60, 29-32, 2011.

はじめに

糸球体濾過量 (GFR) は腎機能の最も正確な指標である。GFR は血漿尿素窒素 (PUN) および血漿クレアチン (PCre) 濃度といった簡易的なマーカー, そしてイヌリン, クレアチニンおよびイオヘキソールなどの指標物質の尿および血漿クリアランス法により評価することができる^{5-7,10,11,16}。PUN および PCre 濃度は迅速に測定でき, 簡便で安価であることから, 臨床現場で最も広く用いられている。しかし, これらのマーカーは体重, 水と状態, 摂食といった多くの腎外性要因にも影響されるため精度が非常に低い。さらに, これらのマーカーは腎機能が重度に低下するまで異常値を示さない。クリアランス法による GFR 測定は精度も高く, 臨床現場において慢性腎臓病 (CKD) の診断に有用であると考えられるが, この検査では手順が煩雑, 時間がかかることもあり, 実施には飼い主および患者, あるいは獣医師のコンプライアンスに依存するため, 指標物質の静脈内投与および検査完了までの拘束が全ての患者で許容されるとは限らない。PUN および PCre と同様に, 1 回の採血で得られた血漿サンプルからスクリーニング検査として GFR を評価でき, 従来のマーカーよりも精度が高いマーカーが必要である。

シスタチン-C (Cys-C) はシステインプロテアーゼインヒビターのスーパーファミリーに属す約 13 KD の低分子蛋白である¹。この蛋白は全ての有核細胞で産生され, その産生量は一定である¹。Cys-C は糸球体で自由に濾過され, 尿細管細胞から分泌されない⁹。原尿中の Cys-C はその 99% が尿細管で再吸収されるが, 尿細管細胞で異化されるため循環中には戻らない^{9,20}。さらに Cys-C は炎症の有無および体重の影響を受けず, また日内変動を示さない。これらのことから血清 Cys-C 濃度は GFR の適切な内因性マーカーであるとされ, ヒトにおける多くの研究で, 血清 Cys-C 濃度は PCre よりも優れた GFR マーカーであることが示されている^{3,8,13,17}。しかし, イヌおよびネコでは Cys-C の臨床的意義に関する報告は非常に限られている^{2,22}。このうち, ネコにおける報告は一つだけで, その論

文では血清 Cys-C 濃度は GFR マーカーとして有用でなかったと結論している¹⁴。イヌにおけるある研究²³では, 血清 Cys-C 濃度は年齢, 性別および体重の影響は受けなかったが, 別の研究⁴では, 1 歳未満および 8 歳以上のイヌで, そして体重が 15 kg 以上のイヌで血清 Cys-C 濃度は高いことを報告している。

血清 Cys-C 濃度はラテックスまたはポリエチレン粒子高感度濁度分析法 (PETIA)^{13,17}, 粒子高感度比濁法 (PENIA)⁸, 金コロイド法²¹, そして酵素免疫吸着法²³といった免疫学的分析法によって測定することができる。イヌおよびネコの報告では, 血清 Cys-C 濃度はポリエチレンを用いた PETIA 法によって測定されている^{2,4,12,14,18,22}。しかし, 日本の検査機関ではポリエチレンを用いた PETIA 法は利用できないため, イヌの Cys-C 濃度をこの方法によって測定するのは困難である。筆者は以前の研究でイヌにおける CysC の有用性を報告したが, ELISA を用いたため, 測定の迅速さに問題があり, スクリーニング検査の一つとして採用することは難しい¹⁵。本研究の目的は, ラテックス凝集反応を利用した PENIA によって CysC を測定し, GFR のマーカーとしての有用性を評価することだった。

材料および方法

供試動物

本検討では, 2008 年 4 月~2010 年 11 月までに腎機能検査を目的に本学医療センター腎臓科を受診した犬 89 頭を対象とした。このうち, 22 頭は正常と判断され, 67 頭は CKD と診断された。これらの動物は検査まで 8 時間絶食とし, 自由飲水とした。

血漿シスタチン C および血漿クレアチニンの測定

血液サンプルは後述するクリアランス検査実施直前に採取され, ヘパリン処理後, 3000 回転 5 分で遠心分離された。血漿 CysC 濃度は市販のラテックス定量試薬キット (LZ テスト, 栄研, 栃木) を用い, 自動分析機 (7180 Automatic Analyzer, 日立) により測定した。同時に酵素法を用いて PCre を測定した。血漿シスタチン C の測定精度

の確認のために行われた測定内変動および測定間変動はそれぞれ 3.9% および 3.2% だった。

血漿イオヘキソール・クリアランスの実施

GFR の測定には、血漿イオヘキソール・クリアランス (PCio) を用いた。PCio 法の手順を要約すると、イオヘキソール (オムニパーク 300, 第一三共) の投与量は、高窒素血症がない動物で 90 mg ヨウ素/kg, そして高窒素血症を示す動物で 45 mg ヨウ素/kg とした。イオヘキソールは橈側皮静脈から 30 秒かけて静脈内投与し (0 分とする), 採血時間は高窒素血症がない動物で投与後 120, 180 および 240 分, そして高窒素血症がある動物では投与後 120, 240 および 360 分とした。血漿サンプル中のヨウ素濃度が 120 mg/ml を超える場合, その動物のイオヘキソール投与前の血漿を用いて希釈した。血漿ヨウ素濃度はセリウムと色素比色定量法により測定された。血漿濃度の時間曲線下面積 (AUC) およびクリアランス (Cl) 値は Broshner-Mortensen (BM) 式で補正した 1 区画モデルにより算出した。PCio 値は体表面積 (BSA) (PCio/BSA, ml/min/m²) で標準化した。BSA は一般的に用いられている式により算出した¹⁹⁾。本章ではイヌでは <30 ml/min/m² を GFR の低下とした。

統計解析

正常群および CKD 群のイヌの血漿シスタチン C 濃度を Mann-Whitney U 検定により比較した。正常群のイヌで血漿 Cys-C 濃度と年齢または体重の関連性を評価するために, 回帰分析およびスピアマン順位相関を実施した。血漿 Cys-C 濃度および PCre 濃度と PCio の関連性を評価するために線形回帰分析を実施した。GFR の低下に対する血清 Cys-C 濃度と P-Cre 濃度の感度および特異度を比較するために受診者動作特性 (ROC) 分析を実施した。特に断らない限り, 測定値は全て中央値 (範囲) で示した。P < 0.05 を有意とした。

結 果

正常なイヌの PCre および CysC 濃度は 0.90 (0.47-1.31) mg/dl および 0.34 (0.23-0.57) mg/L だった。正常犬では, 血漿 CysC は体重と正相関が認められ ($r = 0.613, P < 0.05$), 年齢とは相関しなかった ($r = 0.12, P = 0.785$)。CKD のイヌの血漿 CysC (0.7 [0.25-1.63]) は正常なイヌよりも有意差に高値を示した ($P < 0.01$) [図 1]。また, 血漿 CysC および PCre は PCio と有意な逆相関を示した (それぞれ $r = -0.815, P < 0.001$, および $r = -0.699, P < 0.001$)。ROC 解析で血漿 CysC および PCre の PCio の低下を検出する感度, 特異度およびそのカットオフ値はそれぞれ, 94.3%, 86.2%, 0.42 mg/L および 86.8%, 82.8%, 1.02 mg/dl で, CysC が有意に優れていた ($P < 0.01$)。

体重との相関が認められたことから, 全頭を体重で 2 群に分類した。小型犬 (体重 < 15 kg) のグループでは, 血漿 CysC および PCre の PCio の低下を検出する感度, 特異度およびそのカットオフ値はそれぞれ, 96.6%, 100%, 0.39

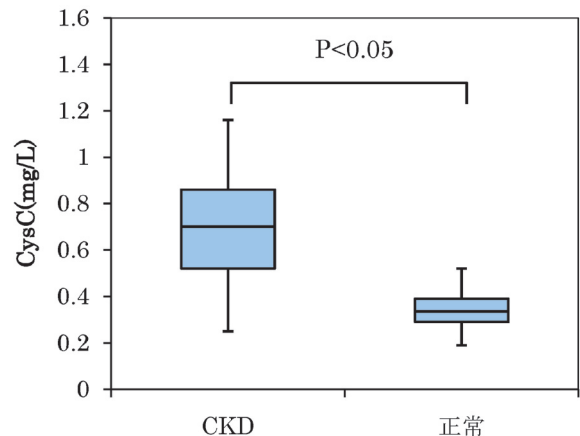


図 1. 正常犬および CKD 患者における血漿シスタチン C の箱ひげ図。

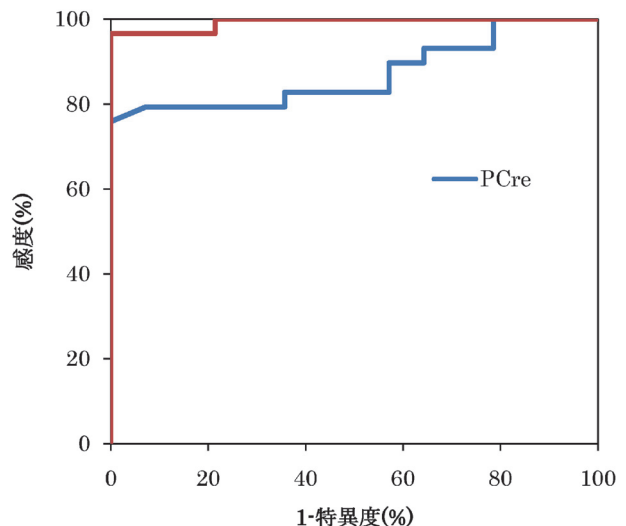


図 2. 体重 < 15 kg の小型犬のグループにおける血漿 CysC および PCre の PCio 低下を検出す ROC 曲線。2 つのパラメータ間で有意差を認めた ($P < 0.05$)。

mg/L および 75.9%, 100%, 1.02 mg/dl で, CysC が有意に優れていた ($P < 0.05$)。大型犬 (体重 > 15 kg) のグループでは, 血漿 CysC および PCre の PCio の低下を検出する感度, 特異度およびそのカットオフ値はそれぞれ, 75.0%, 100%, 0.57 mg/L および 91.7%, 93.3%, 1.21 mg/dl で, 有意差は認められなかった (図 2)。

考 察

ヒトの多くの研究で, Cys-C 濃度は優れた GFR の内因性マーカーであることが示され^{3,8,13,17)}, いくつかの獣医学の研究においても同様のことが示唆されている^{2,22)}。報告されている研究では, ポリエチレン粒子を用いた PETIA 法がイヌの血清 Cys-C 濃度の測定において信頼できることが示されている^{2,4,12,18,22)}。ALMY ら²⁾は, Western blot 法

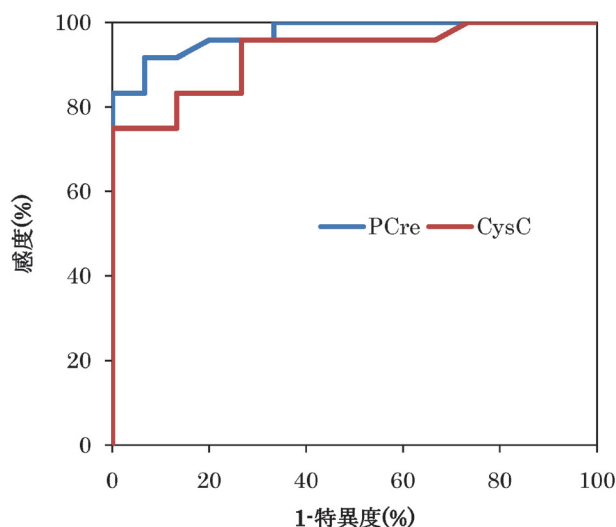


図 3. 体重 > 15 kg の大型犬のグループにおける血漿 CysC および PCr の PCr/Cr 低下を検出する ROC 曲線。2つのパラメータ間で有意差を認めなかった。

により、イヌの Cys-C がウサギポリクローナル抗ヒト Cys-C 抗体と交差反応性を示すことを証明している。今回の研究では、これと同じウサギポリクローナル抗ヒト Cys-C 抗体を用いた測定キットを用いている。しかし、イヌの精製された Cys-C が入手できないため、この方法におけるイヌおよびネコの Cys-C の回収率は評価できなかった。したがって今回の研究では、この方法がイヌの血漿 Cys-C 濃度の正確な測定法かどうかを確認することはできなかった。しかし、測定の再現性が高いことからこの方法によるイヌの血漿 Cys-C 測定の妥当性は得られていると思われる。

他の報告²³⁾と同様に、本研究でも血漿 Cys-C 濃度は年齢の影響を受けなかった。しかし、血漿 Cys-C 濃度は以前の別の研究と同様に、体重に有意な正相関が認められた。BRAUN ら⁴⁾の研究では、体重が 15 kg 未満のイヌでは、15 kg 以上のイヌよりも血清 Cys-C 濃度が有意に低値だったことが示されている。しかし、この研究では GFR が測定されていないため、潜在的に腎機能が低下した個体が含まれていた可能性がある。今回の研究では、全てのイヌの GFR を確認している。ヒトでは体重との相関性は認められておらず、このことが PCr よりも有用であることの理由の一つだが、イヌでは犬種間の体格差が大きいので、体重の影響を受けてしまうのかもしれない。PCr は筋肉量によって血中濃度が変化するが、CysC の産生部位は全ての有核細胞であるため、大型犬では Cys-C を産生する有核細胞の数が相対的に多いと考えられる。

血漿 CysC および PCr のいずれも有意に PCr/Cr と相関したが、PCr/Cr の低下を検出する感度および特異度は有意に CysC が優れていた。WERHNER ら²²⁾は、イヌにおける血清 Cys-C 濃度の感度 (76%) は P-Cr (65%) よりも

有意に高値を示したが、臨床検査として用いる場合に一般的に必要と考えられる感度の 80% よりも低かった。以前の ELISA を用いた研究では、血清 Cys-C 濃度の感度は 90.3% だった。さらに体重で 2 群に分類すると、小型犬で 96.6% と非常に優れた感度を示したが、大型犬では十分な感度が得られなかった。PCr は体格に影響されるため、小型犬では GFR マーカーとしての PCr の有用性は低かったが、反対に大型犬では感度が 90% を超えていた¹⁵⁾。大型犬で血漿 CysC の有用性が低かった理由の一つとして、このグループに含まれたイヌの体重の範囲が非常に広がったことが挙げられる。より大型のイヌではさらに CysC 濃度が高かった可能性がある。しかし、本研究では 40 kg を超えるイヌの十分なサンプル数が得られなかったため、検証できなかった。今後、さらに体重の CysC に対する影響を評価していく必要がある。

本研究の制限として、イヌおよびネコの Cys-C のアミノ酸配列は未だ知られていないため、これらの動物種の Cys-C の抗ヒト Cys-C 抗体に対する反応性はヒトと異なる可能性があり、また使用する抗体によって反応が大きく変動する可能性があることである。イヌにおいて血漿 Cys-C 濃度の有用性を向上させるには抗イヌ Cys-C 抗体を用いた測定法の開発が必須であると思われる。

結論として、血漿 CysC は小型のイヌにおいて非常に有用な GFR マーカーであることが確認された。また、大型犬では感度に関係があり、GFR の評価には PCr が小型犬よりも有用であることも確認された。ラテックス法を利用した自動分析機による測定は非常に簡便で迅速に測定できることから、日常的なスクリーニング検査の一つとして利用可能である。今後、この方法を確立するために、抗体の開発、腎臓以外の変動要因の検索、参考範囲の確立が必要となる。

参 考 文 献

- 1) ABRAHAMSON, M., OLAFSSON, I., PALSDOTTIR, A., ULVSBACK, M., LUNDWALL, A., JENSSON, O. and GRUBB, A. (1990). Structure and expression of the human cystatin C gene. *Biochem. J.*, **268**, 287-294.
- 2) ALMY, F.S., CHRISTOPHER M.M., KING D.P. and BROWN, S.A. (2002). Evaluation of cystatin C as an endogenous marker of glomerular filtration rate in dogs. *J. Vet. Intern. Med.*, **16**, 45-51.
- 3) ANDERSEN, T.B., ESKILD-JENSEN, A., FRØKLÆR, J. and BRØCHNER-MORTENSEN, J. (2008). Measuring glomerular filtration rate in children ; can cystatin C replace established methods? A review. *Pediatr Nephrol* Oct 7 (Published online at <http://www.springerlink.com/content/18071817856mj118/>).
- 4) ANDREW, D. RULRULE, A.D., BAILEY, K.R., SCHWARTZ, G.L., KHOSLA, S., LIESKE, J.C. and MELTON, L.J. 3rd. (2009). For estimating creatinine clearance measuring muscle mass gives better results than those based on demographics. *Kidney Int.* **75**, 1071

- 1078.
- 5) BRAUN, J.P., PERXACHS, A., PERCHEREAUS, D. and DELAFARGE, F. (2002). Plasma Cystatin C in the Dog : Reference values and variations with renal failure. *Clin. Pathol.* **11**, 44-49.
 - 6) BROWN, S.A., FINCO, D.R., BOUDINOT, F.D., WRIGHT, J., TAVER, S.L. and COOPER, T. (1996). Evaluation of a single injection method, using iohexol, for estimating glomerular filtration rate in cats and dogs. *Am. J. Vet. Res.*, **57**, 105-110.
 - 7) FINCO, D.R. and BARSANTI, J.A. (1982). Mechanism of urinary excretion of creatinine by the cat. *Am. J. Vet. Res.*, **43**, 2207-2209.
 - 8) FINCO, D.R., BRASELTON, W.E. and COOPER, T.A. (2001). Relationship between plasma iohexol clearance and urinary exogenous creatinine clearance in dogs. *J. Vet. Intern. Med.*, **15**, 368-373.
 - 9) FINNEY, H., NEWMAN, D.J., GRUBER, W., MERLE, P. and PRICE, C.P. (1997). Initial evaluation of cystatin C measurement by particle-enhanced immunonephelometry on the Behring nephelometer systems (BNA, BNII). *Clin. Chem.*, **43**, 1016-1022.
 - 10) GLEADHILL, A. and MICHELL, A.R. (1996). Evaluation of iohexol as a marker for the clinical measurement of glomerular filtration rate in dogs. *Res. Vet. Sci.*, **60**, 117-121.
 - 11) GLEADHILL, A., PETERS, A.M. and MICHELL, A.R. (1995). A simple method for measuring glomerular filtration rate in dogs. *Res. Vet. Sci.*, **59**, 118-123.
 - 12) HEIENE, R. and MOE, L. (1998). Pharmacokinetic aspects of measurement of glomerular filtration rate in the dog : a review. *J. Vet. Intern. Med.*, **12**, 401-414.
 - 13) JENSEN, A.L., BOMHOLT, M. and MOE, L. (2001). Preliminary evaluation of a particle-enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA) for the determination of serum cystatin C-like immunoreactivity in dogs. *Vet. Clin. Pathol.*, **30**, 86-90.
 - 14) MARTIN, C., PÉCHEREAU, D., DE LA FARGE, F. and BRAUN, J.P. (2002). Plasma cystatin C in cat : current techniques do not allow to use it for the diagnosis of renal failure. *Revue Méd. Vét.*, **153**, 305-310.
 - 15) MIYAGAWA, Y., TAKEMURA, N. and HIROSE, H. (2010). Assessments of factors that affect glomerular filtration rate and indirect markers of renal function in dogs and cats. *J. Vet. Med. Sci.*, **72**, 1129-1136.
 - 16) MIYAMOTO, K. (2001). Use of plasma clearance of iohexol for estimating glomerular filtration rate in cats. *Am. J. Vet. Res.*, **62**, 572-575.
 - 17) NEWMAN, D.J., THAKKAR, H., EDWARDS, R.G., WILKIE, M., WHITE, T., GRUBB, A. and PRICE, C.P. (1995). Serum cystatin C measured by automated immunoassay : a more sensitive marker of changes in GFR than serum creatinine. *Kidney Int.*, **47**, 312-318.
 - 18) PAGITZ, M., FROMMLET, F. and SCHWENDENWEIN, I. (2007). Evaluation of biological variance of cystatin C in comparison with other endogenous markers of glomerular filtration rate in healthy dogs. *J. Vet. Intern. Med.*, **21**, 936-942.
 - 19) PRICE, G.S. and FRAZIER, D.L. (1998). Use of body surface area (BSA)-based dosages to calculate chemotherapeutic drug dose in dogs : I. Potential problems with current BSA formulae. *J. Vet. Intern. Med.*, **12**, 267-271.
 - 20) SCHMITT, R. and BACHMANN, S. (2003). Impact of thyroid dysfunction on serum cystatin C. *Kidney Int.*, **64**, 1139-1140.
 - 21) UCHIDA, K. and GOTOH, A. (2002). Measurement of cystatin-C and creatinine in urine. *Clin. Chim. Acta.*, **323**, 121-128.
 - 22) WEHNER, A., HARTMANN, K. and HIRSCHBERGER, J. (2008). Utility of serum cystatin C as a clinical measure of renal function in dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, **44**, 131-138.
 - 23) Xu, X, Zou, J., Ding, X., Xin, D. and Ren, Y. (2004). Clinical value of serum cystatin C by ELISA for estimation of glomerular filtration rate. *J. Clin. Lab. Anal.*, **8**, 61-64.